Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg/Lahn
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. J. Dittrich
Prof. Dr. U. Willenbockel

DER EINFLUSS VON LEVAMISOL AUF DIE INGESTION UND DIE NITROBLAU-TETRAZOLIUM-REDUKTIONSKAPAZITÄT HUMANER NEUTROPHILER GRANULOCYTEN IM IN-VITRO-VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WOLFGANG HAHM

aus Furth im Wald

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg/Lahn
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. J. Dittrich
Prof. Dr. U. Willenbockel

DER EINFLUSS VON LEVAMISOL AUF DIE INGESTION UND DIE NITROBLAU-TETRAZOLIUM-REDUKTIONSKAPAZITÄT HUMANER NEUTROPHILER GRANULOCYTEN IM IN-VITRO-VERSUCH

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

WOLFGANG HAHM

aus Furth im Wald

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am ..14.7.1978..
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. C. Eschenbach
Coreferent: Prof. Dr. C.-P. Sodomann

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methode	
1. Prinzip des NBT-Tests	1
2. Materialien	2
3. Untersuchte Personen	3
4. Durchführung der Untersuchung	3
4.1. Herstellung d. NBT-Staph-Suspension	3
4.2. Herstellung d. Levamisol-Lösung	4
4.3. Best. d. Zahl d. neutroph. Granulocyten	4
4.4. Berechnung der Inkubationsansätze	5
4.5. Blutentnahme	5
4.6. Herstellung d. Ansätze, Inkubation u. Anfertigung d. Ausstriche	6
4.7. Best. d. Zahl d. neutroph. Granulocyt. im Venenblut, Berech. d. wahren Angebotes von NBT-Staph/NG	6
4.8. Beurteilung d. Ausstriche	7
III. Ergebnisse	
1. Ingestionsindex	9
2. Anteil der ingestierenden NG	9
3. Reduktionsindex	9
4. Reduktionsindex bei def. Ingestionsindex	10
Abbildungen	11
Tabelle	14
IV. Diskussion	15
V. Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	30
Lebenslauf	37
Verzeichnis d. akademischen Lehrer	38

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546006_0013

I. Einleitung

Die Fähigkeit neutrophiler Granulocyten (NG) eingedrungene Krankheitserreger zu phagocytieren, ist eine wichtige Funktion innerhalb des Abwehrsystems des Organismus. Störungen dieser Funktion führen zu schweren Erkrankungen.

In der Literatur finden sich mehrere Untersuchungen zur Frage der Stimulation der phagocytierenden Leukocytenfraktion mit dem Anthelminticum Levamisol (Lev), deren unterschiedliche Aussagen Veranlassung waren, NG auf ihr Verhalten im modifizierten Nitroblau-Tetrazolium-(NBT)-Test unter Levamisoleinfluß zu untersuchen. (5, 6, 7, 19, 21, 22, 27, 31, 33)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Lev auf die Ingestion (Aufnahme) und die NBT-Reduktion (ein Parameter der Digestionsfunktion) menschlicher NG im in-vitro-Versuch quantitativ geprüft. In Vorversuchen wurde für die gewählte Versuchsanordnung die für die Ingestion maximal wirksame Lev-konzentration bestimmt. Weiterhin wurde in Vorversuchen geprüft, ob eine Vorinkubation des Blutes mit Lev erforderlich ist und der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Ingestion wurde geprüft.

II. Methode

II. 1. Prinzip des NBT-Tests

Das Prinzip des Tests beruht darauf, daß man NBT an hitzegetötete Bakterien koppelt und diese, quantitativ kontrolliert, phagocytierenden Leukocyten anbietet. Diese ingestieren die Bakterien und reduzieren das gelbe NBT zu hellblauem Formazan. Die mikroskopische Auswertung erlaubt die getrennte Beurteilung der Ingestion und der NBT-Reduktion.

II. 2. Materialien

Phosphatgepufferte 0,15 M Kochsalzlösung, pH 7,2

p-Nitroblau-Tetrazolium, Fa. Serva, Heidelberg

Heparin, ca. 160 IE/mg, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

Levamisol-HCl, Fa. Janssen, Beerse (Belgien)

Staphylococcus aureus, Stamm SG 511

Die Staphylokokken (Staph) wurden bei einer Temperatur von 37°C 24 Stunden in Glucose-Boullion vermehrt und anschließend durch Hitzeeinwirkung (65°C, 30 min) abgetötet.

Die Bakterienendkonzentration betrug 10^{11}-10^{12} Bakt./ml Suspension. Die Bakteriensuspension wurde in 8 ml-Polystyrolröhrchen abgefüllt und bei -14°C gefroren bis zur Verwendung aufbewahrt.

Filter Nr. 595, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel

Polystyrolröhrchen, 84 mm lang, 14 mm Durchmesser, 8 ml Inhalt, Fa. Sahrstedt-Nümbrecht, Best.-Nr. 8414.

Ich danke der Firma Janssen für die Überlassung der Substanz und ihre Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schiff, Hygiene-Institut der Universität Marburg, für die Herstellung der Bakteriensuspension.

II. 3. Untersuchte Personen

10 gesunde Personen im Alter von 18 bis 40 Jahren, bei deren Auswahl folgende Kriterien berücksichtigt wurden: frei von akuten Infekten, keine Impfung innerhalb der vorhergehenden vier Wochen, keine chronische Medikamenteneinnahme, keine Gravidität.

II. 4. Durchführung der Untersuchung

II. 4.1. Herstellung der NBT-Staph.-Suspension

Zu Beginn jedes Versuches wurde die Staph.-Suspension im Wasserbad 37°C aufgetaut und durch zentrifugieren von der Glucose-Boullion befreit. Die Bakterien wurden dann zweimal gewaschen, indem sie abwechselnd in phosphatgepufferter Kochsalzlösung suspendiert und danach wieder zentrifugiert wurden (3000U/min). So aufbereitet wurden sie eine Stunde im Wärmeschrank bei 37°C mit NBT-Lösung inbibiert. Für das Sediment aus 16 ml Staph-Suspension wurde 1 ml NBT-Lösung eingesetzt.

Zur Herstellung der NBT-Lösung wurden 20 mg NBT in 3 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung unter Erwärmen auf 37°C gelöst und die Lösung anschließend filtriert.

Ein kleiner Teil der NBT-Staph-Suspension wurde im Verhältnis 1:20 mit gepufferter Kochsalzlösung verdünnt und die Zahl der suspendierten Staph pro Volumeneinheit in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die zubereitete NBT-Staph-Suspension enthielt 2 - 5 x 10^9 NBT-Staph/ml.

II. 4.2. Herstellung der Levamisol-Lösung

Die Lev-Lösung wurde aus Stabilitätsgründen für jeden Versuch neu bereitet. Dazu wurden in einem 100 ml Meßkolben 2,4 mg Levamisol-HCl eingewogen und in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gelöst. Von dieser Lösung wurde 1 ml in einen zweiten 100 ml Meßkolben pipettiert und wieder mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufgefüllt. Diese Lev-Lösung ist 10^{-6} molar. Bei Zusatz von 0,1 ml dieser Lösung zu den Inkubationsansätzen der Untersuchungsgruppe, bei einem Gesamtvolumen von 1,5 ml, wurde eine Endkonzentration von $0,66 \times 10^{-7}$ M erreicht.

II. 4.3. Bestimmung der Zahl der NG

Im Kapillarblut der zu untersuchenden Personen wurde die absolute Zahl der NG pro Volumeneinheit bestimmt, indem die Leukocytenzahl mit dem Celloscope und der Anteil der NG im Differentialblutbild bestimmt wurde. Daraus wurde die Zahl der NG pro ml Blut berechnet.

II. 4.4. Berechnung der Inkubationsansätze

Die Untersuchung wurde mit den folgenden Angeboten des Phagocytats durchgeführt:

6;12;5;25;50; und 100 NBT-Staph/NG

Unter Zugrundelegung von 1 ml Blut und der im Kapillarblut bestimmten Zahl der NG sowie der Zahl der NBT-Staph/ml Suspension wurde zunächst das zuzusetzende Volumen der NBT-Staph-Suspension für jeden Ansatz berechnet. Um ein konstantes Ansatzvolumen von 1,5 ml zu erreichen, ergab sich unter Berücksichtigung des Lev-zusatzes (Untersuchungsgruppe) bzw. des Zusatzes von phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) von 0,1 ml, der jeweilige Volumenausgleich für jeden Ansatz.

II. 4.5. Blutentnahme

Den untersuchten Personen wurden 13 - 14 ml Blut aus der Cubitalvene entnommen und mit 0,4 mg Heparin versetzt.

II. 4.6. Herstellung der Ansätze, Inkubation und Anfertigung der Ausstriche.

Die berechneten Volumina der einzelnen Komponenten der Ansätze wurden in folgender Reihenfolge in Polystyrolröhrchen einpipettiert:

1. Volumenausgleich: phosphatgepufferte Kochsalzlösung
2. NBT-Staph-Suspension
3. Lev-Lösung (Untersuchungsgruppe)
   bzw. phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Kontrollgruppe)
4. Blut

Die Ansätze wurden, in leichter Schräglage, 55 - 60 mal in der Minute um ihre Längsachse rotierend, 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden von dem Blut jedes Ansatzes dünne, gleichmäßige Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und ungefärbt mit Eukitt eingedeckt.

II. 4.7. Bestimmung der Zahl der NG im Venenblut und Berechnung des wahren Angebotes von NBT-Staph/NG

Da die Zahl der NG im Kapillarblut in Bezug auf das Venenblut approximativ aufzufassen ist, wurde im Rest des für den Versuch verwendeten heparinisierten Venenblutes die NG-Zahl bestimmt (Doppelbestimmung) und der Berechnung des wahren Angebotes NBT-Staph/NG zugrunde gelegt.

II. 4.8. Beurteilung der Ausstriche

Die Beurteilung der Ausstriche erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop bei einer Vergrößerung von 1 : 800 (Ölimmersion). In jedem Ausstrich wurden 100 NG beurteilt und zwar beginnend am Ausstrichende an den beiden seitlichen Rändern je 50 unausgewählte, unbeschädigte NG. Sie sind im ungefärbten Präparat durch die Kernform, die Granulastruktur und die Zellgröße von den ebenfalls phagocytierenden Monocyten und den eosinophilen Granulocyten sowie nichtphagocytierenden Lymphocyten sicher zu unterscheiden.

Ingestierte NBT-Staph, deren anhaftendes NBT nicht reduziert wurde, erscheinen als graubraune, deren NBT zu Formazan reduziert wurde, als hellblaue bis dunkelviolette Einschlüsse in den NG.

In jedem einzelnen NG wurde die Gesamtzahl der ingestierten NBT-Staph und die Zahl der "reduzierten" NBT-Staph bestimmt. Daraus wurden für jeden Ansatz, das heißt für jede gewählte Relation NBT-Staph/NG, in jedem Versuch folgende Werte errechnet:

1. Ingestionsindex = Zahl der NBT-Staph, die durch 100 NG ingestiert wurden. (NBT-Staph/100 NG)
2. Anteil der an der Ingestion beteiligten NG. (%)
3. Reduktionsindex = Zahl der durch 100 NG reduzierten NBT-Staph, bezogen auf die durch 100 NG ingestierten NBT-Staph. (%)
4. Reduktionsindex bei definiertem, gleichem Ingestionsindex. (%)

Um innerhalb jeder untersuchten Gruppe und für die Versuchsgruppen untereinander vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Werte 1.-3. für die Angebote 10, 20, 40 und 60 NBT-Staph/NG numerisch interpoliert. Aus der gleichen Überlegung heraus

wurde der Reduktionsindex bei definiertem Ingestionsindex für die Ingestionsindices 400, 1000 und 2000 NBT-Staph/100NG berechnet.

Die Signifikanz der Differenzen zwischen den Ergebnissen beider Versuchsgruppen wurde mit Hilfe des t-Tests geprüft.

III. Ergebnisse

Die Ergebnisse und die Signifikanz der Differenzen zwischen den Ergebnissen der beiden Versuchsgruppen sind in Abb. 1 a - d und in Tab. 1a, b dargestellt.

III. 1. Ingestionsindex

In beiden untersuchten Gruppen steigen die Ingestionsindices mit zunehmendem Angebot NBT-Staph/NG. In allen Angebotsbereichen sind die Ingestionsindices der Untersuchungsgruppe (Lev) signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Abb. 1 a, Tab. 1a

III. 2. Anteil der ingestierenden NG

In beiden untersuchten Gruppen steigt der Anteil der ingestierenden NG mit zunehmendem Angebot NBT-Staph/NG. In allen Angebotsbereichen ist der Anteil der ingestierenden NG in der Untersuchungsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Abb. 1 b, Tab. 1a

III. 3. Reduktionsindex

In beiden untersuchten Gruppen steigen die Reduktionsindices mit zunehmendem Angebot NBT-Staph/NG. In den Bereichen der Angebote 10, 20 und 40 NBT-Staph/NG sind die Reduktionsindices der Untersuchungsgruppe (Lev) signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Im Angebotsbereich 60 NBT-Staph/NG ist die Differenz zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant. Abb. 1 c, Tab. 1a

III. 4. Reduktionsindex bei definiertem Ingestionsindex
Unter Zugrundelegung definierter gleicher Ingestionsindices in beiden Versuchsgruppen ergibt sich mit steigenden Ingestionsindices eine Zunahme der Reduktionsindices. Bei den ausgewählten Ingestionsindices besteht zwischen den Ergebnissen der beiden Gruppen keine Signifikanz der Differenzen. Abb. 1 d, Tab. 1 b

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, daß NG unter Leveinfluß NBT-Staph unter den beschriebenen Versuchsbedingungen intensiver ingestieren als in der Kontrollgruppe. Dagegen wird die NBT-Reduktionskapazität der NG, unabhängig vom Ingestionsindex betrachtet, nicht verändert.

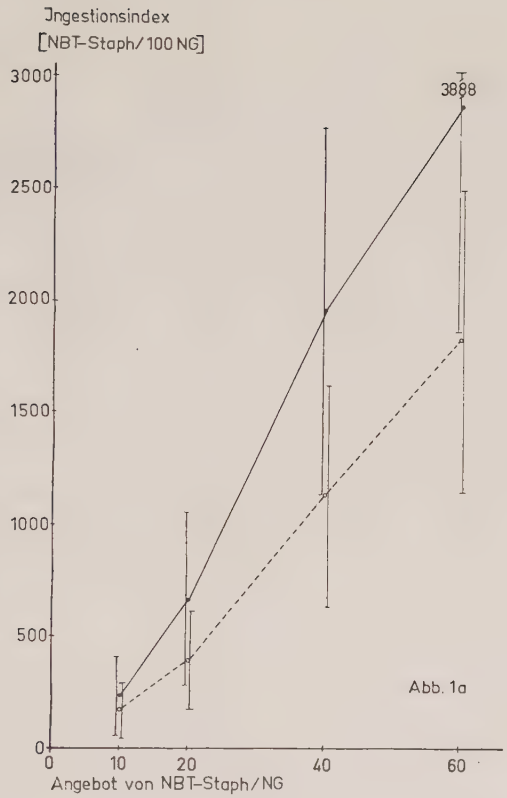


Abb. 1 a - d: Mittelwerte und Standardabweichungen ($\pm$S) n=10 der Ingestionsindices (a), des Anteils der ingestierenden NG (b) und der Reduktionsindices (c) in Abhängigkeit von dem Angebot NBT-Staph/NG und der Reduktionsindices bei definierten Ingestionsindices (d) der Untersuchungsgruppe (————) und der Kontrollgruppe (o----o).

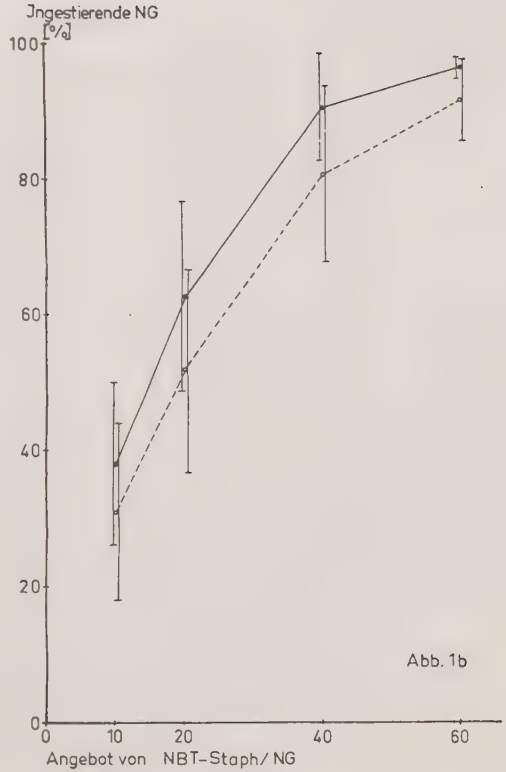

Jngestierende NG
[%]
100
80
60
40
20
0
0
10
20
40
60
Angebot von NBT-Staph/NG

Abb. 1b

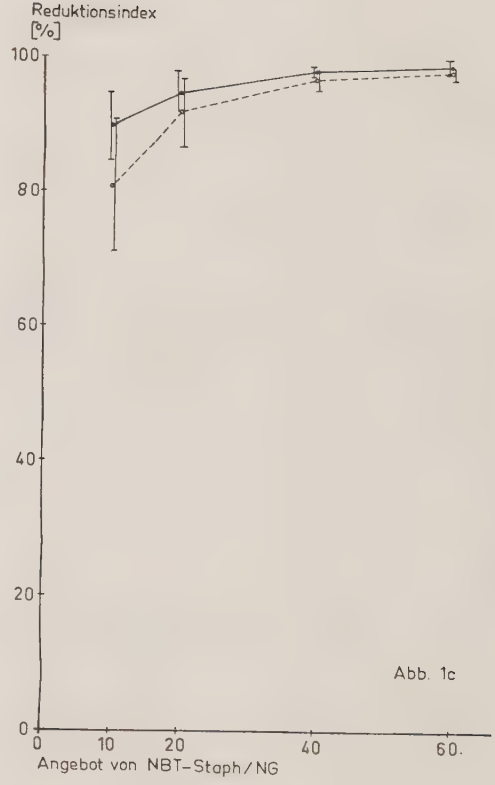

Reduktionsindex
[%]
100
80
60
40
20
0
0
10
20
40
60.
Angebot von NBT-Staph/NG

Abb. 1c

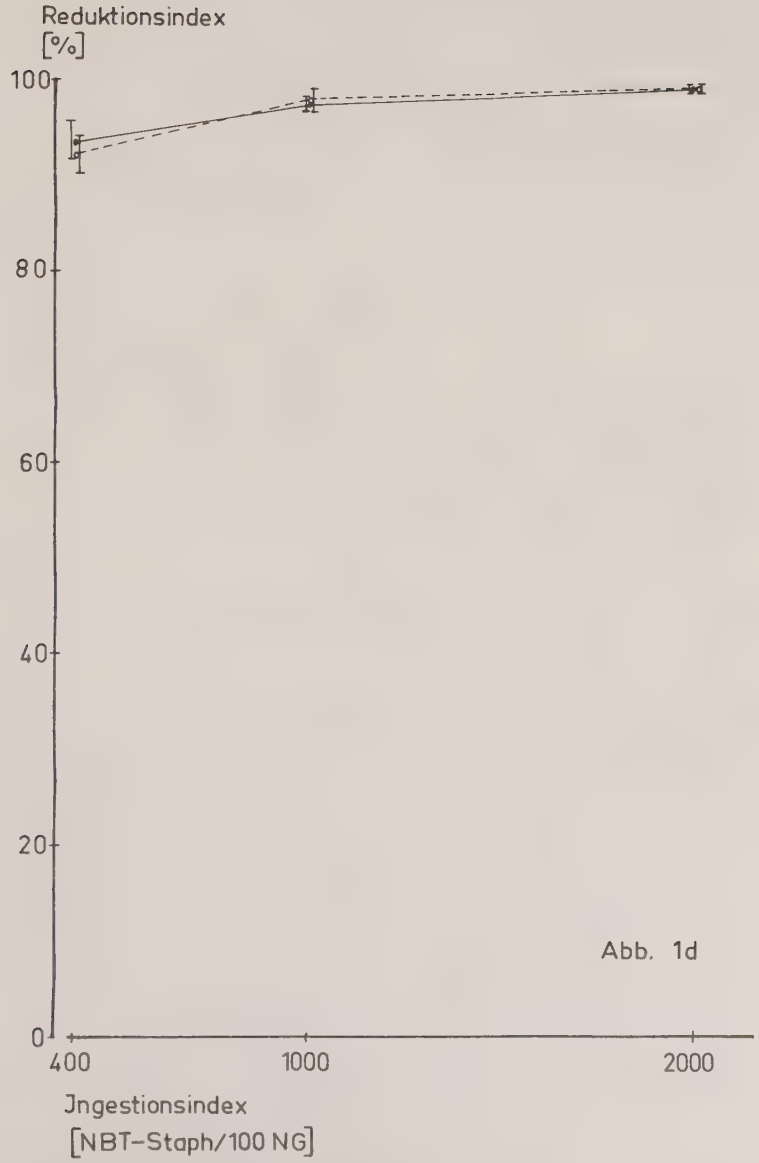

Reduktionsindex
[%]
100
80
60
40
20
0
400
1000
2000
Jngestionsindex
[NBT-Staph/100 NG]

Abb. 1d

Tabelle 1a, b.

Signifikanzen der Differenzen der Mittelwerte der Ingestionsindices, des Anteils der ingestierenden NG und der Reduktionsindices in Abhängigkeit von dem Angebot NBT-Staph/NG und der Reduktionsindices bei definierten Ingestionsindices zwischen der Untersuchungsgruppe und der Kontrollgruppe.

t-Test: xxx:$p \leqq 0,001$; xx:$p \leqq 0,01$; x:$p \leqq 0,05$; O:$p > 0,05$

Tab. 1a

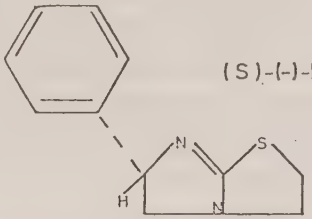
	Angebot von NBT-Staph/NG			
	10	20	40	60
Ingestionsindex	x	xx	xxx	xxx
Anteil ingest. NG	x	xx	xx	x
Reduktionsindex	x	xx	xx	O

Tab. 1b

	Ingestionsindex (NBT-Staph/100 NG)		
	400	1000	2000
Reduktionsindex	O	O	O

IV. Diskussion

IV. 1. Im Anfang der 60er Jahre wurde Tetramisol-HCl als Breitspektrumanthelminticum entwickelt. Es handelt sich um eine weiße kristalline Substanz, geruchlos und von bitterem Geschmack. Die chemische Bezeichnung lautet: dl)2, 3, 5, 6, -tetrahydro-6-phenyl-imidazol(2, 1, -b)thiazol)-HCl



(S)-(-)-HCl

Molekulargewicht: 240, 75

Die Substanz ist gut wasserlöslich, wässrige Lösungen reagieren sauer. Bei alkalischem pH wird die Substanz zu unwirksamen Verbindungen hydrolysiert. Man fand, daß das linksdrehende Isomer bei gleicher Toxizität wirksamer als die rechtsdrehende Form ist und setzt sie seit 1966 unter dem Namen LEVAMISOL in vielen Ländern als Anthelminticum bei Mensch und Tier ein.

Renoux und Renoux (24) berichteten 1971 erstmalig über eine völlig andere Lev-wirkung. Sie impften Mäuse mit einer Brucellavaccine und konnten zeigen, daß der entstandene Schutzeffekt bei Mäusen, die gleichzeitig Lev erhielten, wesentlich ausgeprägter war, als bei Mäusen, die ohne gleichzeitige Lev-gabe geimpft worden waren. Die nächstliegende Erklärung des Effekts, direkte antibakterielle Wirkung der Substanz, konnte ausgeschlossen werden.

Das war der Anfang vielfältiger Untersuchungen zur Wirkung des Lev auf das Abwehrsystem. Bis heute hat das thematische Spektrum ein derartiges Ausmaß angenommen, daß

eine umfassende Darstellung den Rahmen dieser Diskussion sprengen würde.

Themabezogen muß an dieser Stelle von Schutzversuchen berichtet werden, die von anderen Autoren (10, 11, 18) mit anderen Tierarten - Ratten, Schweine, Hühner - und mit anderen Erregern - Salmonellen, Staphylokokken, Streptokokken - beschrieben wurden und die das zuerst gefundene Ergebnis bestätigten. Andere Untersucher fanden, daß Lev den Schutzeffekt einer Coliimpfung vermindert (26) und auf die Produktion von Influenzaantikörpern nur einen schwachen, vorübergehenden Effekt hat. (3)

Clearanceuntersuchungen mit kolloidalen Kohlenstoffpartikeln im Blutkreislauf von Mäusen endeten übereinstimmend mit dem Ergebnis, daß Lev die Clearance dieser Partikel steigert.

Die Untersucher machten durch Lev stimulierte, phagocytierende Leukocyten für die beschleunigte Partikelelimination verantwortlich. (15, 20, 30)

Die Frage der Stimulation der Phagocytose durch Lev wurde von mehreren Autoren an Peritonealmakrophagen und NG untersucht. (5, 7, 10, 11, 19, 21, 27, 31, 33) Als Phagocytat dienten Streptokokken, Salmonellen, Staph. aureus, Candida und Latexpartikel. Das Lev wurde den Phagocytosetestanordnungen direkt zugesetzt (5, 7, 33) oder die Versuchstiere wurden vor der Blutentnahme zur Phagocytoseuntersuchung ein oder mehrere Tage mit Lev behandelt. (10, 11, 19, 21, 27, 31) Die Autoren fanden eine Steigerung der Phagocytose durch Lev.

Zwei Untersucher konnten das in-vivo gefundene Ergebnis in-vitro nicht reproduzieren. (10, 11)

Weitere Hinweise auf eine Stimulation der Phagocytose durch Lev wurden von Anderson (1) und Van Oss (31) gefunden. Anderson fand bei Lev-gabe gesteigerte Chemotaxis der NG. Van Oss berichtet "levamisole renders macrophages more hydrophilic" und interpretiert diesen Effekt im Sinne stärkerer Phagocytosebereitschaft.

Zur Erklärung der Steigerung der Phagocytoseaktivität durch Lev gibt es verschiedene gedankliche Ansätze. Sie gehen im Prinzip von zwei unterschiedlichen Überlegungen aus. Eine Gruppe von Autoren geht von einem indirekten Einfluß des Lev auf phagocytierende Zellen über Serumfaktoren aus. (6, 7, 15, 30) Sie machen makrophagenaktivierende Mediatoren aus Lymphocyten oder die verstärkte Synthese von Opsonisationsfaktoren für den Lev-effekt verantwortlich. Es gelang auch der Nachweis eines Serumfaktors mit dem die Steigerung der Carbon-Clearance von Lev-behandelten Mäusen auf unbehandelte Mäuse übertragbar ist. (30)

Andere Untersucher schlossen aus Experimenten mit Makrophagen auf direkte Wirkung des Lev auf die Phagocytoseaktivität durch Veränderung der cAMP- und der cGMP-Konzentration in der Zelle. (14, 22, 25, 29) Oliveira et al (22) zeigten, daß die Phagocytoseaktivität der Makrophagen von ihrem cAMP-Gehalt abhängig ist. Hohe cAMP-Konzentrationen (10^{-4}M) in der Zelle, sie wurden durch Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase erreicht, verringern die Phagocytoseaktivität. Niedrige cAMP-Spiegel (10^{-10}M) wurden unter Einwirkung von Imidazol und Phenylimidazol, also chemisch dem Lev ähnlichen Substanzen, beobachtet.

Sie stimulieren die Phagocytose antikörpertragender Partikel durch die untersuchten Zellen.

Hadden et al (14) und Sunshine et al (29) konnten zeigen, daß Lev die cGMP-Phosphodiesterase hemmt und die cAMP-Phosphodiesterase aktiviert, so daß in den Zellen der cGMP-Spiegel steigt, der cAMP-Spiegel aber fällt. Sie konnten weiter zeigen, daß hohe cGMP-Spiegel auf immunkompetente Zellen vielfältige Wirkungen haben. So verstärkt sich die T-lymphcytäre Cytotoxizität, die Proliferation von Lymphocyten und Makrophagen nimmt zu und Makrophagen phagocytieren verstärkt.

IV. 2. Die neutrophilen Granulocyten erlangen ihre Bedeutung für die Infektabwehr des menschlichen Organismus durch die Ingestion und Digestion eingedrungener belebter und unbelebter Partikel. Die Ingestion beginnt damit, daß das zu ingestierende Partikel an der Oberfläche des NG adherent wird. Dann wird es von Pseudopodien des NG umhüllt. Diese Pseudopodien verschmelzen miteinander und formen sich als Ganzes zu einer Invagination der Zellmembran um, die dann nach innen abgeschnürt wird. Jetzt befindet sich das ingestierte Partikel, umhüllt von zelleigener Membran, im Inneren der Zelle; es ist ein Phagosom entstanden.

Der nächste Schritt zur Eliminierung des ingestierten Materials ist die sogenannte Degranulierung. NG enthalten zwei verschiedene Granulaarten. In der Reihenfolge ihres Erscheinens im reifenden Granulocyten werden sie als primäre und sekundäre Granula bezeichnet. Die Primärgranula enthalten hydrolytische Enzyme, Myeloperoxidase, Lysozym und kleinmolekulare, baktericid wirkende Proteine. Die Sekundärgranula enthalten Lactoferrin, alkalische Phosphatase und ebenfalls verschiedene baktericid wirkende Proteine. Diese Granula bewegen sich, durch einen ungeklärten Mechanismus, auf das Phagosom zu, verschmelzen damit und verschwinden so aus dem Cytoplasma:Degranulation. Ihre Enzyme wurden histo- und biochemisch in den Phagosomen nachgewiesen. Sie sind für die sich anschließende Digestion des Phagosomeninhalts von Bedeutung. Der erste und wesentliche Schritt dazu ist die Abtötung des ingestierten Partikels. Es ist bedeutungslos, ob belebte oder unbelebte Partikel ingestiert werden, im Fall einer stattgefundenen Ingestion wird immer das baktericide System der NG aktiviert. Dabei wird das

Ausmaß der Aktivierung von der Ingestionsintensität bestimmt. Mit der Degranulation gelangt ein ganzes Arsenal baktericider Substanzen in das Phagosom. Lysozym, Lactoferrin, Hydrolasen verschiedener Substratspezifität und verschiedene kleinmolekulare Proteine, alle entfalten neben lytischen Eigenschaften auch baktericide Wirkungen, die für das baktericide Gesamtpotential der NG ergänzende Bedeutung haben. Der wirksamste Baktericidieeffekt der NG ist die Denaturierung bakterieller Proteinstrukturen mittels Jod, das durch Jodidoxidation unter dem katalytischen Einfluß der Myeloperoxidase entsteht. Als Oxidationsmittel fungiert dabei formal Wasserstoffsuperoxid, aber ob dabei nicht in Wirklichkeit Superoxidanionen oder Hydroxylradikale die wesentliche Rolle spielen und das Wasserstoffsuperoxid nur die erste faßbare Abbaustufe der Überschußproduktion derselben ist, ist noch strittig. Als Wasserstoffdonor zur Wasserstoffsuperoxidbildung dient entweder $NADH+H^+$, das über eine Transhydrogenasereaktion mittels $NADPH+H^+$ entsteht, das selbst wiederum im, von der Glucose-6-phosphatdehydrogenase abhängigen, Hexosemonophosphatweg entsteht, oder das $NADPH+H^+$ selbst.

Die Funktion dieses baktericiden Systems ist vom Vorhandensein aller Komponenten abhängig. Es sind angeborene Mangelkrankheiten beschrieben, bei denen schwere septische Krankheitsbilder auftreten: Progressiv septische Granulomatose, Glutathionperoxidasemangel, Glucose-6-phosphatdehydrogenasemangel der Leukocyten. (2, 4, 12, 16, 17, 23, 28)

IV. 3. Die Prüfung der Stimulation der Wasserstoffsuperoxidbildung bei phagocytierenden Zellen ist mit verschiedenen Methoden möglich. Zum einen kann der Glucoseverbrauch im Hexosemonophosphatweg bestimmt werden, zum anderen kann die Sauerstoffaufnahme bei selektiver Hemmung anderer sauerstoffabhängiger Stoffwechselvorgänge bestimmt werden. (28) Beides sind jedoch technisch relativ aufwendige Methoden.

Eine technisch leicht durchführbare Methode ist der NBT-Test. Das Prinzip des NBT-Test beruht darauf, daß gelbes NBT von phagocytierenden Leukocyten ingestiert oder durch Diffusion aufgenommen und zu hellblauem Formazan reduziert wird, das spektrophometrisch oder mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die Reduktion des NBT zu Formazan ist mit der Wasserstoffsuperoxidbildung korreliert, der Reduktionsmechanismus an sich ist nicht geklärt. Wird in einer Zelle Formazan mikroskopisch nachgewiesen, so ist damit gezeigt, daß diese Zelle NBT sowohl aufgenommen als auch zu Formazan reduziert hat. Läßt sich in einer Zelle kein Formazan nachweisen, so ist keine Aussage darüber möglich, ob diese Zelle NBT aufgenommen, jedoch nicht zu Formazan reduziert hat oder ob die NBT-Reduktion normal ist, aber kein NBT ingestiert wurde. Um eine Differenzierung zwischen NBT-Aufnahme und NBT-Reduktion zu ermöglichen, gibt Eschenbach et al (8) folgende Modifikation an:
Das NBT wird an hitzegetötete Staphylokokken gekoppelt, also an einen lichtmikroskopisch sichtbaren Träger, der dann den Leukocyten, quantitativ kontrollierbar, als Phagocytat angeboten wird. Damit werden getrennte Aussagen über Ingestionskapazität und NBT-Reduktionskapazität möglich.

Die Zahl der intrazellulär gelegenen NBT-Staph läßt, unabhängig vom Reduktionsgrad, eine quantitative Aussage über die Ingestion zu und die Bewertung der Färbung der Bakterien, lichtblau bis violett im positiven, graubraun im negativen Fall, erlaubt eine Bewertung der NBT-Reduktion. Man kann mit dieser Methode das Verhältnis des Angebots NBT-Staph/NG kontrolliert variieren. Es ist möglich die Ingestion von NBT-Staph und die Reduktion des an die Staph gebundenen NBT getrennt zu untersuchen. Damit werden folgende Korrelationen ermöglicht:

Angebot - Ingestion
Angebot - ingestierende NG
Angebot - Reduktion
Ingestion - Reduktion

Der wesentliche Vorzug der modifizierten Methode besteht darin, daß die NBT-Reduktionskapazität der NG unabhängig von der Ingestion beurteilbar wird. Die Untersuchungen können im Vollblut oder in Suspensionen separierter Leukocyten vorgenommen werden. Man fand, daß Leukocyten nach Ingestion von Latexpartikeln, Zymosan, Candida, Pseudomonas aeruginosa, oder Escherichia coli eine höhere NBT-Positivität entwickeln als Leukocyten, die dem NBT-Test ohne zusätzlichen Ingestionsreiz unterzogen wurden. Eine ingestionsunabhängige Stimulation ist mit Endotoxin möglich. Ein natürlicher Reiz zu verstärkter NBT-Reduktion sind bakterielle Infektionen. NG von Patienten mit akuten bakteriellen Infektionen reduzieren NBT in signifikant höherem Maß als NG von Personen mit viralen Infekten oder Gesunden. Man fand auch, daß NG von Neugeborenen und schwangeren Frauen gesteigerte NBT-Positivität aufweisen. In allen Fällen konnte mit der modifizierten Methode gezeigt werden, daß die NBT-

Reduktionskapazität unverändert ist und daß die veränderte Ingestionskapazität für die gesteigert positiven NBT-Testergebnisse verantwortlich ist. An NG von Patienten mit progressiv septischer Granulomatose konnte bestätigt werden, daß die NBT-Ingestion normal verläuft, aber die NBT-Reduktion vermindert ist. (8)

IV. 4. Ich wählte den modifizierten NBT-Test als Untersuchungsmethode, weil er quantitativ kontrollierte und differenzierte Aussagen zur Ingestion und Digestion ermöglicht. Ich erwartete, damit den bisher mit dem übergeordneten Begriff Phagocytosesteigerung beschriebenen Lev-effekt genauer charakterisieren zu können.

Ich beschränkte die Untersuchung auf NG, weil für die anderen phagocytierenden Leukocyten unter den beschriebenen Versuchsbedingungen keine sichere Aussage möglich ist. Sowohl für Monocyten als auch für eosinophile Granulocyten gilt, daß die Zahl der beurteilbaren Zellen in den Ausstrichen zu gering ist.

IV. 5. In Vorversuchen prüfte ich zunächst, welchen Einfluß verschiedene Lev-konzentrationen (10^{-3}M bis 10^{-9}M) auf den Ingestionsindex der NG bei einem konstanten Angebot von 50 NBT-Staph/NG haben. Ich orientierte mich dabei an den Konzentrationsangaben von De Cock (6) und fand ein Wirkungsmaximum für die Lev-konzentration $0,66 \times 10^{-7}$M.

Dann prüfte ich die Frage, welchen Effekt eine zeitlich der NBT-Staph-Zugabe vorhergehende Inkubation der NG mit der maximal wirksamen Lev-konzentration hat. Ich prüfte 1/2 - 1- und 2 stündige Vorinkubationszeiten und fand den deutlichsten Effekt für den Fall, daß die NBT-Staph und das Lev gleichzeitig zu den Ansätzen gegeben wurden.

Weiter untersuchte ich, nach welcher Inkubationszeit die Ingestionssteigerung durch Lev am deutlichsten ist. Dazu verlängerte ich die Inkubationszeit, beginnend bei 15 Minuten in 15 minütigen Schritten bis auf 4 Stunden. Dabei fand ich die höchsten Ingestionsindices mit der deutlichsten Differenz zwischen Untersuchungsgruppe und Kontrollgruppe nach 30 minütiger Inkubationszeit. Bei längeren Inkubationszeiten liegen die Ingestionsindices, bei unwesentlich veränderten Differenzen zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe, insgesamt niedriger. Auch eine Begasung der Versuchsansätze mit O_2 brachte keinen anderen Effekt.

Das Angebot NBT-Staph/NG beschränkte ich auf maximal 100 : 1, da bei höheren Angeboten zunächst die durch Lev stimulierten NG, bei noch höherem Angebot auch die NG der Kontrollgruppe so stark ingestieren, daß sie dadurch so fragil werden, daß sie der mechanischen Beanspruchung während der Inkubationszeit und bei der Anfertigung der

Ausstriche nicht gewachsen sind. So werden bei der Auswertung die am stärksten ingestierenden NG nicht mehr erfaßt und falsch zu niedrige Ingestionsindices gefunden. Außerdem wird bei sehr dichter Packung der NBT-Staph im NG die mikroskopische Auswertung unsicher.

IV. 6. Meines Wissens wurde bisher lediglich von zwei Autoren der Einfluß von Lev auf die NBT-Aufnahme und -Reduktion durch Leukocyten bearbeitet. De Cock et al (6) untersuchte das Verhalten NG Gesunder im in-vitro-Versuch. Er inkubierte NG in verdünntem Blut eine Stunde mit Lev verschiedener Konzentration ($2,5 \times 10^{-10}$M - $2,5 \times 10^{-5}$M) und bot dann NBT zur Aufnahme an. Er fand in der Lev-gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Vermehrung der Zellen mit Formazaneinschlüssen. Maximale Wirkung erreichte er mit einer Lev-Konzentration $2,5 \times 10^{-7}$M.

Griscelli (13) behandelte drei Patienten mit progressiv septischer Granulomatose mit Lev und fand nach der Lev-behandlung im nichtmodifizierten NBT-Test mehr NBT reduzierende NG als vorher. Die Steigerung des Ergebnisses war aber nicht signifikant, sondern hielt sich im Rahmen der krankheits-bedingten Schwankungen.

In der von den Autoren gewählten Versuchsanordnung war es nicht möglich, zwischen NBT-Ingestion und NBT-Reduktions-kapazität zu trennen. Nach den vorliegenden eigenen Ergebnissen müssen die Ergebnisse von De Cock et al (6) als Ausdruck der Steigerung der NBT-Aufnahme gedeutet werden.

Die negativen Ergebnisse von Griscelli (13) stehen in Über-einstimmung mit den eigenen Ergebnissen der normalen NG, daß Lev die NBT-Reduktionskapazität der NG nicht steigert.

Lev steigert die Ingestion der NG, somit auch die Ingestion von NBT, beeinflußt aber erwartungsgemäß die NBT-Reduktionskapazität der Zellen nicht.

V. Zusammenfassung

Aus mehreren Veröffentlichungen war die ingestionssteigernde Wirkung des Levamisol bekannt. Von zwei Autoren wurde für die Untersuchung der NBT-Test herangezogen. Einer der Autoren fand eine Steigerung der NBT-Positivität der neutrophilen Granulocyten hämatologisch Gesunder.

Meine Fragestellung war, ob die gesteigerte NBT-Positivität ausschließlich die Folge einer gesteigerten NBT-Aufnahme oder eine Folge der gesteigerten NBT-Reduktion oder eine Kombination beider Komponenten war.

Durch Vorversuche wurde die anzuwendende Levamisol-konzentration und die Inkubationsdauer bestimmt. Außerdem wurde festgestellt, daß eine Vorinkubation nicht erforderlich ist.

Die Untersuchung wurde an neutrophilen Granulocyten im in-vitro-Versuch, im Vollblut haematologisch gesunder, infektfreier Versuchspersonen mit Hilfe des modifizierten NBT-Tests durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen:

1. Levamisol steigert die Ingestion von NBT-Staph durch neutrophile Granulocyten signifikant. (Ingestionsindex)
2. Levamisol steigert den Anteil der ingestierenden neutrophilen Granulocyten signifikant.
3. Levamisol steigert den NBT-Reduktionsindex bei den Angeboten 10 - 40 NBT-Staph/NG signifikant.
4. Bei Betrachtung des NBT-Reduktionsindex unabhängig von der Ingestion ergab sich im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Untersuchungsgruppe kein Einfluß des Levamisol auf die Ergebnisse. (Reduktionskapazität)

Levamisol steigert die Ingestion neutrophiler Granulocyten, beeinflußt jedoch in der gewählten Versuchsanordnung die NBT-Reduktionskapazität dieser Zellen nicht.

Welcher Mechanismus dem beschriebenen Effekt zugrunde liegt, ist bisher unbekannt.

Literaturverzeichnis:

1. Anderson, R., Glover, A., Koornhof, H. J., Rabson, P.:
In vitro stimulation of neutrophil motility by levamisole. Maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole treated neutrophils.
J. Immunol 117, 428 - 432 (1976)

2. Baehner, R. L.:
Disorders of leukocytes leading to recurrent infection.
Pediat. Clin. N. Amer. 19, 935 - 956 (1972)

3. Brugmans, J., Schuermans, V., De Cock, W., Th npont, D., Janssen, P., Verhaegen, H., Van Nimmen, L., Louwagie, A. C., Stevens, F.:
Restoration of host defense mechanism in man by levamisole.
Life Sci. 13, 1499 - 1504 (1973)

4. Cooper, M. R., De Chatelet, L. R., Mc Call, C. E., Spurr, C. L.:
The activated phagocyte of polycythemia vera.
Blood 40, 366 - 374 (1972)

5. De Cock, W., De Cree, J., Verhaegen, H.:
The effect of levamisole on phagocytosis of latex particles by human neutrophils in vitro.
persönliche Mitteilung.

6. De Cock, W., Verhaegen, H., De Cree, J.:
The effect of levamisole in vitro on the nitro blue Tetrazolium reduction to formazan by polymorphonuclear neutrophils.
persönliche Mitteilung.

7. De Cree, J., Verhaegen, H., De Cock, W., Vanheule, R., Brugmans, J., Schuermans, V.:
Impaired neutrophil phagocytosis.
Lancet II, 294 - 295 (1974)

8. Eschenbach, C., Seebach, G., Müller-Lissner, St.:
NBT-Reduktionskapazität von neutrophilen Granulocyten.
Klin. Wschr. 53, 1049 - 1056 (1975)

9. Fisher, G. W., Oi, V. T., Kelley, J. L., Podgore, J. K., Bass, J. W., Wagner, F. S., Gordon, B. L.:
Enhacement of host defense mechanisms against gram-positive pyogenic coccal infections with levamisole in neonatal rats.
Ann. Allergy 33, 193 - 198 (1974)

10. Fisher, G. W., Oi, V. T., Ampaya, E. P., Kelly, J. L., Bass, J. W.:
Enhanced host defense mechanism with phenyl-imidothiazole.
Pediat. Res. 8, 44 (1974)

11. Fisher, G. W., Podgore, J. K., Bass, J W., Keeley, J. L., Kobayashi, G. Y.:
Levamisole in suckling rats.
J. Infect. Dis. 132, 578 - 581 (1975)

12. Good, R. A., Quie, P. G., Windhorst, D. B., Page, A. R., Rodey, G. E., White, J., Wolfson, J. J., Holmes, B. H.:
Fatal (chronic) granulomatous disease of childhood: A hereditary defekt of leukocyte funktion.
Semin. Hematol. V, 215 - 254 (1968)

13. Griscelli, C.:
Traitement des deficits immunitaires congenitaux par le levamisole.
persönliche Mitteilung

14. Hadden, J. W., Coffey, R. G., Hadden, E. M., Lopez Corrales, E., Sunshine, G. H.:
Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels.
Cell. Immunol. 20, 98 - 103 (1975)

15. Hoebke, J., Franchi, G.:
Influence of tetramisole and its optical isomers on the mononuclear phagocytic system.
Effect on carbon clearence in mice.
J. Reticuloendothel. Soc. 14, 317 - 323 (1973)

16. Holmes, B., Good, R. A.:
Laboratory models of chronic granulomatous disease.
J. Reticuloendothel. Soc. 12, 216 - 237 (1972)

17. Holmes, B., Park, B. H., Malawista, S. E., Quie, P. G., Nelson, D. L., Good, R. A.:
Chronic granulomatous disease in females.
A deficiency of leukocyte glutathione peroxidase.
New Engl. J. Med. 283, 217 - 221 (1970)

18. Huskisson, F.C., Dieppe, P.A., Scott, J., Trapnell, J., Balme, H.W., Willoughby, D.A.:
Immunostimulant therapy for rheumatoid arthritis.
Lancet I, 393 - 395 (1976)

19. Ippen, H., Quadripur, S.A.:
Levamisole zur Behandlung von Hautkrankheiten.
Dtsch. Med. Wschr. 100, 1710 - 1711 (1975)

20. Mayr, A.:
The influence of levamisole on the carbon clearance in mice.
persönliche Mitteilung

21. Moese, J.R.:
Levamisol im Phagocytose-Rattentest
persönliche Mitteilung

22. Oliveira Lima, A., Javierre, M.Q., Dias da Silva, W., Sette Camara, D.:
Immunological phagocytosis: Effect of drugs on phosphodiesterase activity.
Experientia 30, 945 - 946 (1974)

23. Quie, P.G., Hill, H.R.:
Granulocytopathies
Disease-a-month, 2-35 (1973)

24. Renoux, G., Renoux, M.:
Effet immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par brucella abortus.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 2720, 349 - 350 (1971)

25. Renoux, G., Renoux, M.:
Modulation of immune reactivity by phenylimidothiazole salts in mice immunized by sheep red blood cells.
J. Immunol. 113, 779 - 790 (1974)

26. Schulze, H. J.:
Testung von Levamisol auf seine abwehrsteigernde Wirkung im Mäuseschutzversuch.
persönliche Mitteilung

27. Schulze, H. J., Raettig, H. J.:
Steigerung der Aktivität von Peritonealmakrophagen der Maus durch Levamisole.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 622 - 623 (1973)

28. Stossel, T. P.:
Phagocytosis.
New Engl. J. Med. 290, 717 - 723, 774 - 780, 833 - 839 (1974)

29. Sunshine, G., Lopez-Corrales, E., Hadden, E. M., Coffey, R. G., Wanebo, H., Hadden, J. W., Rojas, A.:
Levamisole and imidazole: In vitro effects in mouse & man and their possible mediation by cyclic nucleotides.
In "Second international conference on modulation of host immune resistance in the prevention or treatment of induced neoplasias"
E. D. Chirigos, M. A., Fogarty International Center Proceedings, U. S. Goverment Printing Office, Washington D. C., USA, in press.

30. Van Ghinkel, R.F., Hoebeke, J.:
Carbon clearance enhancing factor in serum from levamisole treated mice.
J. Reticuloendothel. Soc. 17, 65 - 72 (1975)

31. Van Oss, C.J.:
Effect of levamisole on contact angle and on phagocytosis by macrophages.
persönliche Mitteilung

32. Verhaegen, H., De Cree, J., De Cock, W., Verbruggen, F.:
Levamisole and the immune response.
New Engl. J. Med. 289, 1148 - 1149 (1973)

33. Versijp, G., Van Zwet, T.L., Van Furth, R.:
Levamisole and functions of peritoneal macrophages.
Lancet I, 798 (1975)

Herrn Prof. Dr. C. Eschenbach danke ich für die Überlassung des Themas und die Leitung dieser Arbeit.

Lebenslauf:

Ich wurde am 2.1.1951 als erstes Kind des Verwaltungsangestellten Joachim Hahm und seiner Ehefrau Gisela, geb. Böhm, in Furth im Wald, Kr. Cham, geboren. Meine beiden Brüder wurden 1953 und 1960 geboren.
1955 zog ich mit meinen Eltern nach Stadtallendorf um. Dort besuchte ich von 1957 bis 1961 die Grundschule und anschließend die Gesamtschule in Kirchhain, an der ich 1969 im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig die Reifeprüfung ablegte. Danach leistete ich ein zweijähriges Praktikum in der Herrenwald-Apotheke, Stadtallendorf, ab und bestand 1971 vor der Apothekerkammer Kassel die pharmazeutische Vorprüfung. Im Wintersemester 71/72 wurde ich an der Philippsuniversität Marburg immatrikuliert und studiere seitdem am FB Medizin.

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Amon, Ax, Aziz, Baltzer, Barthelmai, Bode, Braasch, Buchholz, Daume, Dennhardt, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Ehrhardt, Eißner, Eschenbach, Exner, Friedrich, Fruhstorfer, Ganz, Gerdes, Geus, Golenhofen, Graul, Grundner, Habermehl, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Hensel, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Jacob, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser, Knauff, Knoll, Koransky, Kuni, Lange, Lauer, Lehmann, Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Müller, Naber, Neurath, Niemeyer, Oepen, Petry, Pohlen, Portig, Pots, Priebe, Riecken, Rodeck, Rohen, Rupec, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmid, Schmitz-Moormann, Siegert, Siegrist, Slenczka, Sodomann, Solcher, Straub, Struck, Sturm, Stutte, Uhlarik, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Willenbockel.